

## 1

## 明 細 書

## 炎症性腸疾患の予防および治療剤

## TECHNICAL FIELD

本発明は、炎症性腸疾患の予防および治療剤、ならびにこれを用いた治療方法に関する。

## BACKGROUND ART

クローン病や潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease : IBD)は、緩解・増悪を繰り返す難治性疾患である。その原因として自己免疫異常や腸内細菌等の関与が想定されているものの、未だに明らかにされてはいない(Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 1998;115:182-205.)。今日、IBDに対する様々な薬物治療が行われているが、従来の治療法では緩解導入が困難、または副作用のため治療を継続することができない患者も多い。このような薬物治療による緩解導入不能例では外科的に消化管切除を余儀なくされるため、QOL(Quality Of Life)の維持という側面からも、より副作用が少なくかつ効果的な薬物治療の開発が望まれている。

腸炎を含む様々な炎症反応には、活性酸素による酸化ストレスが関係していることが知られている。活性酸素はその産生と消去によって細胞内シグナル伝達機構を制御する、トックス制御と呼ばれる一連の細胞内シグナル伝達制御機構を形成しており、このトックス制御を担う主要分子のひとつに、チオレドキシン(Thioredoxin : TRX)があげられる。TRXは、成人T細胞白血病由来因子としてクローニングされた、Cys-Gly-Pro-Cys配列によるチオール・ジスルフィド反応を介した酸化還元反応制御能を持つ多機能分子である(Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai K, Yokota T, Wakasugi H, et al. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. Embo J 1989;8:757-64.)。その機能は、reactive oxygen species (ROS)の還元・産生低下に加え NF- $\kappa$ B や Rel

などの転写因子活性化や ASK-1 の不活性化による MAPK へのシグナル伝達の抑制などを介したアポトシスの抑制・細胞防御反応の増強など様々な報告がなされ (Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:421-55.), 生体防御の増強に関与していることが知られている。

IBD 由来の粘膜組織では ROS の産生が亢進しているにもかかわらず Cu/Zn-SOD や還元型チオールなどの抗酸化分子の産生が低下しており (Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996;41:2078-86.; McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996;98:136-41.), IBD における病変局所では ROS と抗酸化分子の産生に不均衡が生じていると考えられる。

同様に、IBD のモデルである dextran sulfate sodium (DSS) 由来の炎症性腸疾患における病変局所においても、抗酸化分子の産生低下が報告されている (Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Surg Res* 2002;102:144-9.)。この DSS 腸炎モデルは、比較的再現性の高い大腸炎症性病変の誘導能に優れ (Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.), 薬剤の治療効果判定に最も広く用いられているモデルである。

本発明者らは、DSS 腸炎モデルマウスを用いてチロドキシンの腸炎抑制効果を見いだし、本発明を完成するに至った。

本発明は、チロドキシンを有効成分とする炎症性腸疾患予防および治療剤、ならびにこれを用いた炎症性腸疾患の治療方法を提供することを目的とする。

## SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、チロドキシンを活性を有するファミリーに属するポリペプチド類から選ばれる１種又は２種以上を有効成分とする炎症性腸疾患予防および治療剤、ならびにこれを用いた炎症性腸疾患の治療方法に関する。

## BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING FIGURES

図1; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg DSS)マウス(Thioredoxin-Transgenic DSS colitis model mouse)および野生型 DSS 腸炎マウス(Wild-DSS)マウス(Wild Type DSS colitis mouse)における DSS 投与開始後の体重変化を、パーセンテージで表す。

図 2-A; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg-DSS)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(Wild Type:Wt)における、大腸の長さの計測値を表す。

図 2-B; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg-DSS)および野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)における、Bloody stool score を表す。

図 3; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg-DSS)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(C57BL/6)における、遠位大腸の HE (hematoxylin-eosin) 染色標本を表す。

図 4-A; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg-DSS)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(C57BL/6)における、Histological score (inflammation severity および Inflammation extent)を表す。

図 4-B; TRX-Tg DSS 腸炎マウス(Tg-DSS)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(C57BL/6)における、Histological score (crypt damage および total colitis)を表す。

図 5; rhTRX 投与を行った DSS 腸炎マウス(TRX100-ip)および野生型 DSS 腸炎マウス(Wild-DSS)における体重変化を表す。

図 6; rhTRX 投与を行った DSS 腸炎マウス(TRX5mg/kg-ip)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(Wt)における、大腸の長さの比較を表す。

図 7; rhTRX 投与を行った DSS 腸炎マウス(TRX5mg/kg i.p.)、野生型 DSS 腸炎マウス(Wt-DSS)およびコントロール(C57BL/6)における、遠位大腸の HE (hematoxylin-eosin) 染色標本を表す。

図 8-A; rhTRX 投与を行った DSS 腸炎マウス(TRX5mg/kg-ip)、野生型 DSS 腸炎マウス

マウス(Wt-DSS)およびコントロール(Wt)における、Histological score (inflammation severity および Inflammation extent)を表す。

図 8-B; rhTRX 投与を行った DSS 腸炎モデルマウス(TRX5mg/kg-ip)、野生型 DSS 腸炎モデルマウス(Wt-DSS)およびコントロール(Wt)における、Histological score (crypt damage および total colitis)を表す。

#### DISCLOSURE OF THE INVENTION

本明細書においては、チロチン活性を有するファミリーに属するポリペプチド類には、チロチン活性を有するものであれば、リコペプチドからポリペプチド(タンパク質)まで広く含まれる。

本発明は、以下の炎症性腸疾患の治療剤および治療方法を提供する。

1. チロチンスーパーファミリーのポリペプチドの1種または2種以上を有効成分とする炎症性腸疾患治療剤。
2. 炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎またはクローン病である項1に記載の治療剤。
3. チロチンスーパーファミリーのポリペプチドがヒトチロチンである項1に記載の治療剤。
4. 炎症性腸疾患の治療方法であって、ここで炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎またはクローン病であり、チロチンスーパーファミリーに属するポリペプチドの有効量を、当該治療を必要とする患者に投与することを含む方法。
5. 成人に対し、チロチンを体重1kgあたり1-100mg程度の治療有効量を投与する項5に記載の方法。

チロチン活性を有するファミリーは、活性中心に配列-Cys-X-Y-Cys-(X及びYは同一、又は異なる20種類の天然アミノ酸のいずれかを示す。)を有しており、チロチンスーパーファミリー(以下、「TRXファミリー」と略することがある)と呼ばれている。

TRXファミリーに属するポリペプチドとしては、活性中心に配列-Cys-Gly-Pro-Cys-、-Cys-Pro-Tyr-Cys-、-Cys-Pro-His-Cys-、-Cys-Pro-Pro-Cys-を有するポリペプチド類を例示することができ、これらの中でも、活性中心に配列-Cys-Gly-Pro-Cys-を有するポリペプチド類が好ましい。

また、TRXファミリーに属するポリペプチドには、ヒトを含む動物のチロチン(ヒトを含む動物のADF)、大腸菌などの細菌のチロチン、酵母のチロチン等のチロチン;ヒトADF活性を

有するポリペプチド (ヒトADFP) ; ヒト、大腸菌等のチロチン等が含まれる。

TRXファミリーに属するポリペプチドとしては、チロチンが好ましく、特にヒチロチン及び酵母チロチンが好ましい。酵母チロチンは、酵母から単離したものでもよいが、チロチンを多く含む酵母の形態で使用することもできる。

これらTRXファミリーに属するポリペプチド類は、本発明の炎症性腸疾患治療剤に、単独で、又は2種以上組み合わせて含有させることができる。

TRXファミリーに属するポリペプチドは、細菌(大腸菌)、酵母、植物及び動物、特にヒを含む哺乳動物(ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、モモット、ラット、マウス、ウサギなど)由来のいずれであってもよい。また、TRXファミリーに属するポリペプチドは、天然物を精製する方法、遺伝子組換え法により、酵母、大腸菌等から得られるものであってもよく、TRX活性を有する限り、その1又は複数、好ましくは1または数個のアミノ酸を置換、付加、欠失等した誘導体であってもよい。

チロチンを含む該ポリペプチド類は、酸化型であっても還元型であってもよいが、好ましくは還元型である。

治療される腸疾患としては、炎症性腸疾患があげられ、例えば、潰瘍性大腸炎およびクローン病をはじめ、細菌・寄生虫・ウイルス・真菌等による感染性腸炎、薬剤・化学物質等に起因する薬剤性腸炎、放射線照射による放射線照射性腸炎、虚血性大腸炎、閉塞性腸炎、直腸孤立性潰瘍、限局性腸炎および出血性大腸炎等がある (Intestinal disorders to be treated include inflammatory bowel diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease, infectious colitis caused by bacterial, parasite, viral and fungal infection, drug-induced colitis caused by drugs and chemical compounds, irradiation colitis, ischemic colitis, obstructive colitis, solitary rectal ulcer and hemorrhagic colitis.)。

本発明に係る炎症性腸疾患治療剤の投与経路としては、経口及び非経口のいずれでも投与することができ、臨床医によって適宜選択される。また、有効成分であるチロチンを、単独または通常用いられる担体と共に投与することができる。

本発明の予防および治療剤を経口投与する場合は、薬剤の形態として、錠剤、被覆錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤等の固形製剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等の液状製剤、エアゾール剤、アトマイザ-、ネブライザ-等の吸入剤、およびリポソーム封入剤等があげ

られる。

本発明の予防および治療剤を非経口投与する場合は、薬剤の形態として静脈注射、皮下注射、皮内注射、筋肉注射および腹腔内注射などに使用される注射剤（液剤、懸濁剤等）、液剤、懸濁剤、乳剤、点滴剤、坐剤、軟膏剤などがあげられる。

本発明の予防および治療剤が液状製剤である場合は、凍結保存または凍結乾燥等により水分を除去して保存してもよい。凍結乾燥製剤は、使用時に注射用蒸留水等を加え、再度溶解して使用される。

本発明に係る予防および治療剤に利用される薬学的に許容される担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、吸収促進剤、保湿剤、吸着剤、滑沢剤、充填剤、増量剤、付湿剤、防腐剤、安定剤、乳化剤、可溶化剤、浸透圧を調節する塩、緩衝剤等の希釈剤又は賦形剤を例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。

さらに、本発明に係る予防および治療剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を含有させて、剤として調製することもできる。

炎症性腸疾患に対するTRXファミリーに属するポリペプチドの有効量は、当業者が従来の技術を参考に容易に決定することができるが、例えば、体重1kgあたり0.1-100mg程度、好ましくは0.1-10mg程度、最も好ましくは1-10mg程度であり、これを1日あたり1-3回に分けて投与することができるが、各種製剤の形態、患者の性別、年齢、疾患の程度に合わせて適宜調節することが好ましい。

本発明に係る予防および治療剤は、現在、炎症性腸疾患の主たる治療法であるステロイド薬療法と併用することができ、これによりステロイド薬の使用量の低減および離脱が期待される。

## 実施例

以下、本発明を実施例に基づき、より詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことは言うまでもない。

## マウス及び試薬

9-11週齢、体重20-22gの雌C57BL/6マウス(CLEA Japan, Shizuoka, Japan)をコントロール及びdextran sulfate sodium (DSS)腸炎モデル作成に用いた。B6由来のTRX-Tg (Thioredoxin Transgenic)マウスおよびrhTRX(recombinant human Thioredoxin)は

味の素株式会社より供給された。

また、特に、高分子量の DSS を用いた腸炎モデルにおいて遠位大腸に最も顕著な粘膜組織障害・炎症細胞浸潤・粘膜下浮腫・潰瘍形成等の炎症性病変が形成され、用量依存性に障害が増強されることが知られていることから (Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002;123:256-70.), 本実施例では、分子量 36,000-50,000 の 3%DSS 溶液を用いた腸炎モデルマウスにおいて肛門から 1.5cm の大腸組織における組織障害の程度を評価した。

#### 腸炎の総合評価

- (a) 体重は、各日における変化を 0 日目の体重に対する変化率(%)で示した。
- (b) 摘出した大腸の全長を計測した。TRX-Tg マウスにおける DSS 腸炎モデルではさらに糞便中の血液含有を Bloody stool score (表 1) (Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Yang M, Nakase H, Deegler LL, Sylander ED, Rittman B, Bendele A, Sartor RB, Lichenstein HS. A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;123:1151-62.)に従って評価した。
- (c) 肛門側 1.5cm の大腸を 10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン固定後薄切標本作製した後ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin-eosin)染色を行って光学顕微鏡にて観察した。
- (d) 組織学的評価はHistological scoring system (表 2) (Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, DaCosta CM, Haldeman KM, Sartor RB, Lund PK. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* 2001;120:925-37.)に従って 0.5cm ごと 3 カ所で行い、それぞれの部位における点数の平均にて決定した。

#### 統計学的検討

得られたデータは平均値±標準誤差で表示した。Histological score は統計ソフト

Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用い t 検定にて算出し、 $P < 0.05$ を有意とした。

#### 実施例 1. TRX-Tg マウスにおける DSS 腸炎の臨床・組織学的検討

C57BL/6 マウス (コントロール群、 $n=10$ ) および TRX-Tg マウス (Tg 群、 $n=10$ ) に 3% (w/v) DSS (MW 36,000-50,000, ICN Pharmaceuticals Inc. California, USA) を 7 日間自由飲水にて連日投与した。DSS 投与直前 (0 日目) から投与終了直前 (7 日目) まで連日体重を測定し、DSS 投与終了後エーテル麻酔下にと殺した後、全大腸を摘出し、腸炎の評価を行った。

DSS 投与開始後 6 日目、7 日目の体重減少は Tg 群でコントロール群に比して有意に軽度であった (Fig. 1)。また大腸の全長を計測したところその計測値は Tg 群でコントロール群に比して有意に高値であり (Fig. 2-A)、Bloody stool score も Tg-DSS 群でコントロール群に比して有意に低値であった (Fig. 2-B)。

HE 染色標本による組織学的検討では、Wt-DSS 群で遠位大腸を中心に炎症細胞浸潤とクリプトの損傷、びらん・潰瘍形成を認めたが Tg-DSS 群ではこれらの所見の改善が認められた (Fig. 3)。Histological scoring system による評価では、Inflammation extent・Crypt damage・Total colitis の各項目において Tg 群で有意な改善を認めた (Fig. 4-A, B)。

#### 実施例 2. DSS 腸炎モデルに対するトリコン・ナントチロド・キシン治療効果の検討

C57BL/6 マウスに 3% (w/v) DSS を自由飲水にて 5 日間連日投与し、更に 5 日間純水投与にて飼育し 10 日目まで連日体重を測定した。DSS 投与開始直前 (day0) よりコントロール群 ( $n=10$ ) には 150  $\mu$ l の phosphate buffer saline (PBS) を、治療群 ( $n=10$ ) には PBS 150  $\mu$ g に溶解したトリコン・ナントチロド・キシン 5mg/kg を連日腹腔内投与した。治療開始後 10 日目にエーテル麻酔下にと殺し、全大腸を摘出し腸炎の評価を行った。

DSS 投与開始後 5 日目 (day 5) 以降 10 日目 (DSS+5) までの体重減少は、治療群でコントロール群に比して有意に軽度であった (Fig. 5)。また、大腸の全長を計測したところ、計測値は治療群でコントロール群に比して有意に高値であった (Fig. 6)。

さらに HE 染色標本における組織学的検討では、PBS 投与群でみられた組織破壊・炎症所見が TRX 投与群で著明な改善が認められた (Fig. 7)。Histological scoring system による評価では、Inflammation severity・Inflammation extent・

Crypt damage・Total colitis のすべての項目において治療群で有意な改善を認めた (Fig. 8-A, B)。

実施例より、(1) TRX-Tg マウスを用いた検討で腸炎抑制に関する TRX の重要性、および(2) 治療目的での TRX 単剤投与が腸炎を改善することがわかった。これらの結果は TRX が潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患に対する治療薬としての効果を示唆するものである

### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、体内でも発現する内因性のオルタンパクであるオルトキシンを有効成分とするため、副作用の心配がない炎症性腸疾患の予防および治療剤、ならびにこれを用いた炎症性腸疾患の治療法を提供することができる。

What is claimed is:

1. フォレトキシン-パ-ファミリー-のポリペプチドの1種または2種以上を有効成分とする炎症性腸疾患治療剤。
2. 炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎またはクローン病である請求項1に記載の治療剤。
3. フォレトキシン-パ-ファミリー-のポリペプチドがヒトフォレトキシンである請求項1に記載の治療剤。
4. 炎症性腸疾患の治療方法であって、ここで炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎またはクローン病であり、フォレトキシン-パ-ファミリー-に属するポリペプチドの有効量を、当該治療を必要とする患者に投与することを含む方法。
5. 成人に対し、フォレトキシンを体重1kgあたり1-100mg程度の治療有効量を投与する請求項5に記載の方法。

## 要 約 書

フォドキシ活性を有するファミリーに属するポリペプチド類から選ばれる1種又は2種以上を有効成分とする炎症性腸疾患治療剤に関する。